防治蛴螬的乳状芽孢杆菌——鲁乳1号的研究及应用

宋协松　亓树亮
(山东省花生研究所)

摘要　1977年从山东临沭县大蔡庄大队罹病的大黑鳃金龟(*Holotrichia oblita* Faldermann)蛴螬体内筛选出一株乳状菌的新菌系——鲁乳1号。此菌孢子囊较大(3.238×0.803微米),一端或两端具有折光性很强的伴孢体,单伴孢体大为0.78×0.57微米,双伴孢体较小,一端为0.66×0.57微米,另一端为0.54×0.43微米,芽孢为1.411×0.693微米;此菌对我国普发性金龟孵优势虫种大黑鳃金龟有较高的致病力。用喂食的方法生产菌剂已获成功。室内喂食试验致病率达65.6(38.8—100)%。田间每亩用2.5万亿活芽孢时致病率为37.96(25.0—64.7)%,虫口减退率77.2(47.0—85.7)%,防治效果达68.6(43.0—83.0)%,芽孢能在土壤内长期存活,并扩散流行,是控制蛴螬危害的有效病原菌。

我国蛴螬种类多、危害重、尤其大黑鳃金龟蛴螬,不但危害重、而且防治难,是花生、粮食、蔬菜和苗木等多种植物中最重要的害虫。已有报道日本金龟乳状芽孢杆菌(*Bacillus popilliae* Dutky)对此虫不感染。1977年9月16日,我所在山东首先采到了自然感染的大黑鳃金龟蛴螬,取其体内病原经过多次注射、喂食试验筛选出对此虫敏感的新菌系——鲁乳1号。1977—1981年我们对该菌的形态、生理生化反应及生物学特性、菌剂的生产和应用等进行了比较系统的研究,证明此菌是大黑蛴螬的有效病原,具有较高的实用价值。

材 料 与 方 法

一、鲁乳1号的分离和致病率的测定

将首次采集的自然感染乳状菌病的蛴螬用清水把体表泥沙冲洗干净,再用无菌水冲洗2—3次。把虫置于70℃温水内5—6分钟后取出用消毒剪刀剪断后足胫节取血,血平摊于消毒的载玻片上,稍干后两玻片血面相向对严,制成血涂片,存放于干燥器内备用。

(一) 注射筛选　血涂片表面先用棉球蘸75%酒精擦1—2遍,再用无菌水多次冲洗,放于经过消毒的培养皿和0.1%胰化胨液内,用刀将玻片揭开冲洗,将菌液装于离心管内,在60℃温水内活化20分钟,4000转/分离心15分钟,重复2—3次。血球计数板计算每毫升的含菌量。用自制千分之一微量注射器在蛴螬腹侧4—5节间进行注射。每注射一头要擦洗针头,每头蛴螬注射100万菌/3.6微升。注射后的蛴螬放于土质和食料充足的罐头瓶里,28—30℃室内饲养,每隔3—5天检查加食一次,除掉死虫取出病虫,记述病状变化并统计致病率。同时挑选发病快、致病率高的菌系反复进行提纯筛选。

(二) 喂食筛选　挑选致病快、症状明显的蛴螬取其菌血制成菌剂(用甘薯粉做介质

本文于1981年6月收到。
蒙杨明华同志指导并拍照片。胡宝珏、黄玉璋、张孟先、徐秀娟同志参加部分工作,在此一并致谢。

每克含 10 亿芽孢）每瓶放菌剂 1 克，2--3 龄健壮蛴螬 3—5 头，在 26—30℃ 室内进行致病率测定及提纯筛选。

（三）盆栽试验　采用直径 30 厘米、高 34 厘米白瓷罐，每罐用 25 亿菌、播花生 10 粒、接大黑 3 龄幼虫 10 头，置于室内 40 天检查结果。

（四）水泥池试验　池长 1.8 米、深 1.0 米、宽 1.6 米。拌 106.56 亿菌于切碎的油菜叶中，将油菜撒于播种沟内，接大黑 3 龄幼虫 180 头，播 30 粒花生于 35 日后检查。

（五）田间小区试验　小区面积 0.006—0.01 亩，区间挖小沟（深 0.8—1.0 尺，宽 1.0 尺）排水并避免蛴螬进出，每区接虫 180 头，方法同上。

（六）大面积示范　1980 年春季在四个县五个大队选虫口密度 25.6(8.0—58.0) 头/米^{2}的花生地 6.64 亩，5 月上旬每亩用 2.5 万亿菌拌于麦麸上，撒施在花生播种沟内并于 6 月底调查结果。 夏末秋初花生生长期间又在四个县七个大队选虫口密度 60.8 (4.0—106.0) 头/米^{2}的严重田块 10 亩，将菌剂施于花生墩周围的土内，在花生收获时调查效果。

二、鲁乳 1 号生活史和形态观察

采用喂食感染方法对该菌在寄主体内的发育过程和形态特征进行了观察。每日取菌测量大小、进行形态描述至虫死为止。

三、寄主范围的测定

（一）虫种见表 3。

（二）方法　采用注射和喂食两种感染方法。

四、菌剂的制做

采用喂食感染法进行。先让虫吞食菌剂，第 8 天起开始饲喂马铃薯等喜食饵料，室温 26—28℃ 下，20—25 天芽孢即发育成熟。 此时将患病蛴螬集中，用冷水冲洗表面的泥沙，然后取菌血或直接捣碎过滤制成浓缩的菌液。稀释 100 倍后用血球计数板计算菌量，浓缩菌液加水和甘薯粉混匀凉干、磨碎过筛后包装。标准菌剂每克含菌量为 10 亿芽孢。

试 验 结 果

一、对大黑蛴螬的致病率

（一）春季试验见表 1。

表 1 的测定指出，鲁乳 1 号对大黑鳃金龟蛴螬有一定的致病力。 室内致病率高达 100%，田间高达 64.71%，效果显著。

（二）夏秋季试验见表 2。

表 2 指出，在花生生长期施用该菌对各龄幼虫均可致病，对初孵幼虫尤甚。 因此防治当年低龄蛴螬有较好的效果。施菌地块花生受害也轻。收获期调查致病率仍达 30% 以上，较对照（未施菌）可增产 126.3—155.9%，效果明显。

二、形态和生活史

形态　营养体短杆状，3.927(2.31—5.005)×0.524(0.308—0.77) 微米，单链或双链。孢子囊似履状，一端钝圆，一端稍尖。孢子囊的一端或两端具有折光性强的伴孢体，单伴孢体约占 80—90%，双伴孢体约占 10—20%（图版 I：3—6），孢子囊大小为 3.238×0.803 微米，单伴孢体为 0.78×0.57 微米，比双伴孢体要大些，而双伴孢体大小也不一样，一端

表 1　鲁乳 1 号对大黑 3 龄蛴螬的致病率 (1978—1980)

试验 地点	试验 方法	总虫 (头)	病虫 (头)	感病率 (%)	感病幅度 (%)
室内	注射	1270	823	64.8	39.9—94.8
	喂食(罐头瓶)	1016	689	65.6	38.9—100.0
	喂食(大罐)	177	82	45.5	32.8—59.8
田间	水泥池	36	18	50.0	50.0
	小区	54	20	36.0	30.8—37.7
	大面积	108	41	37.96	25.0—64.71

注：感病率与感病幅度均为校正后数值。

表 2　鲁乳 1 号对大黑蛴螬低龄幼虫田间试验

试验地点	面积 (亩)	调查 ($米^2$)	虫果率 (%)	防治效果 (%)	虫口 ($头/米^2$)	虫口减退率 (%)	折产量 (斤/亩)	较对照增产 (%)
乳山县午极大队	3.5	4	15.2	82.8	14.0	84.1	773.3	126.3
对照	0.2	2	88.4	—	88.0	—	341.7	—
蓬莱县邓格庄	3.5	6	20.3	72.4	10.5	80.2	426.7	155.9
对照	0.2	3	73.5	—	53.0	—	166.7	—
胶南县辛庄	3.0	9	50.2	43.1	13.2	47.2	186.7	143.4
对照	0.2	4	88.3	—	25	—	76.7	—

为 0.66×0.57 微米，另一端为 0.54×0.43 微米，芽孢大小为 1.411×0.693微米。

生活史　寄主吞食孢子后先在肠道内萌发繁殖，最后侵人血腔。观察到杆菌在血腔内的发育大体可分为 4 个时期，第 1 期为芽孢萌发期，芽孢萌发失去折光而膨大，此时血淋巴透明，历时 2—3 天，发育为第 2 期即营养体增殖期，此时营养体大多为单链或双链，罹病蛴螬血淋巴混浊，约需 6 天左右 (图版 I：1,2)，营养体进一步发育为第 3 期即伴孢体形成期，此时菌体膨大而拖尾，出现具微弱折光性的芽孢 (图版 I：3)，继之产生折光性伴孢体，此时罹病蛴螬病状明显，约 12 天左右，发育为第 4 期即芽孢成熟期，此时罹病蛴螬血淋巴中由于充满具有强折光性的芽孢和伴孢体(图版 I：4，5，6) 而呈牛乳状，随之死亡，约需 25 天左右。一头染病的 3 龄蛴螬中，可含孢子 8×10^9—11×10^9 个。

三、寄主范围

鲁乳 1 号的寄主范围 (表 3) 较窄，大黑鳃金龟蛴螬是易感虫种，其次是黑皱鳃金龟，其它金龟均不感染。

四、生物学特性

(一) 在培养基 (1.5% 酵母膏，0.3% K_2HPO_4，0.2% 葡萄糖，2% 琼脂)上，28—30℃条件下，培养 2 天，菌落乳白色圆形，大小为 0.7×0.3 厘米，此时可见到双链短杆状营养体，但仅有个别能发育成芽孢。革兰氏反应阴性，过氧化酶反应阴性。

(二) 温度对致病和死亡的影响。 鲁乳 1 号是大黑鳃金龟蛴螬的一种慢性病原菌。

表 3 用鲁乳 1 号喂食不同种类蛴螬

虫 种 名 称	总 虫（头）	病 虫（头）	感病率（%）	感病幅度（%）	校正感病率（%）	备注
大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* (Fald.)	56	34	60.71	40.91—80.0	57.14	
对照	12	1	8.3			自感
黑皱鳃金龟 *Trematodes tenebroides* Pallas	56	19	33.93	15.4—66.67		
蒙古丽金龟 *A. mongolica* Fald.	55	2	3.64			自感
棕色鳃金龟 *H. titanis* Reitter	57	2	3.51			自感
暗黑鳃金龟 *H. morosa* Waterhouse	17	0				
铜绿丽金龟 *Anomala Corpulenta* Motsch.	41	0				
毛棕鳃金龟 *Brahmina faldermanni* Kraatz	40	0				
云斑鳃金龟 *Polyphylla laticollis* Lewis	23	0				

蛴螬得病后食欲减少，发育停滞而死亡。死亡速率与温度有密切关系，温度低时能带病越冬，存活达 200 余天，温度高染病 10 天左右即可死亡，幼龄死亡更快。试验指出，土壤温度在 18℃ 以下未见得病，20—30℃ 是染病适温，28℃ 尤为合宜。菌剂防治效果的高低与当时的土壤温度关系极为密切。

五、防治效果与施用技术

（一）菌剂介质 对幼虫致病率的高低和快慢与菌粉中的介质关系很大。以甘薯粉为介质致病率 65.45%，效果最好。其它如细粘土为 10.87%，硅藻土为 14.85%，滑石粉为 15.38%，碳酸钙为 9.8%。

（二）稀释饵料 用菌剂拌土的致病率为 63.19%，拌油菜叶为 70.85%，拌麦麸为 56.3%，拌花生饼为 58.08%，拌地瓜丝为 71.25%，拌萝卜丝为 43.04%，拌菠菜叶 57.08%。菌液浇沟致病率为 70.64%，墩施为 65.51%。以上饵料的效果均不错。唯有菌粉拌花生种致病率仅为 13.36%，效果最差。

（三）感病的有效菌量和亩施菌量 试验指出蛴螬食入 100—9,000 个杆菌致病率为 16.0%，1—200 万个 16.2%，300—400 万个 30.2%，500—5,000 万个为 34.19%，食菌量越多，致病率越高。每亩用 500 亿个活菌致病率为 4.4%，5,000 亿个为 7.8%，10,000 亿个为 17.9%，30,000 亿个为 26.1%，随着每亩用菌量的增加发病率亦有增高的趋势。每亩以施用 2.5—3.0 万亿菌为宜，不应少于 1,000 亿菌。

讨 论

一、关于鲁乳 1 号的定名问题

鲁乳 1 号与日本金龟乳状菌有明显的不同（见表 4）。它们的形态、寄主和发现地点都是不同的。目前多数人都同意将有伴孢体的乳状菌归为日本金龟乳状芽孢杆菌，而在其下设立变种。鉴于鲁乳 1 号同日本金龟乳状芽孢杆菌的明显区别，现将其定名为 *Bacillus popillae var. Shandong*。

表 4　鲁乳 1 号与日本金龟乳状菌之比较

主要内容		鲁乳 1 号	日本金龟乳状菌
病原形态	孢子囊大小（微米）	3.094×0.803	2.449×0.836
	芽孢大小（微米）	1.411×0.693	1.193×0.762
	A 伴孢体大小（微米）	0.716×0.547	0.585×0.578
	B 伴孢体大小（微米）	0.539×0.433	无
对寄主反应	菌液注射大黑蛴螬致病率（%）	65.10	14.5
	菌剂喂食大黑蛴螬致病率（%）	76.40	0
	菌液注射蒙古丽蛴螬致病率（%）	0	61.5
	菌液注射铜绿丽蛴螬致病率（%）	0	30.6
革兰氏反应		阴性	阴性
过氧化氢酶反应		阴性	阴性
发现地点		中国山东临沭县大蔡庄	美国

二、关于菌剂生产问题

鲁乳 1 号与其它乳状菌一样，目前尚不能在培养基上繁殖。我们在注射繁菌的基础上采用喂食繁菌获得成功。此法工序简便、不用特殊设备、蛴螬不受损伤、致病率强、孢子产量高。生产队用育甘薯苗的温床，温度低时上罩塑料薄膜，即可生产菌剂自用。

鲁乳 1 号是致死大黑鳃金龟蛴螬的一种重要的慢性病原菌，它适应性强、分布面广，自然寄生率高。在大黑鳃金龟发生区如能繁殖流行，可望发挥更大的作用。

参　考　文　献

张书芳、冯祥兴、刘玉滨等　1980　我国主要蛴螬对乳状菌的敏感性。昆虫学报 23(2)：178—82。

宋协松、张孟先、胡宝珏等　1977　花生蛴螬 A 型乳状菌的发现及初步研究。花生科技 (3—4)：45—50。

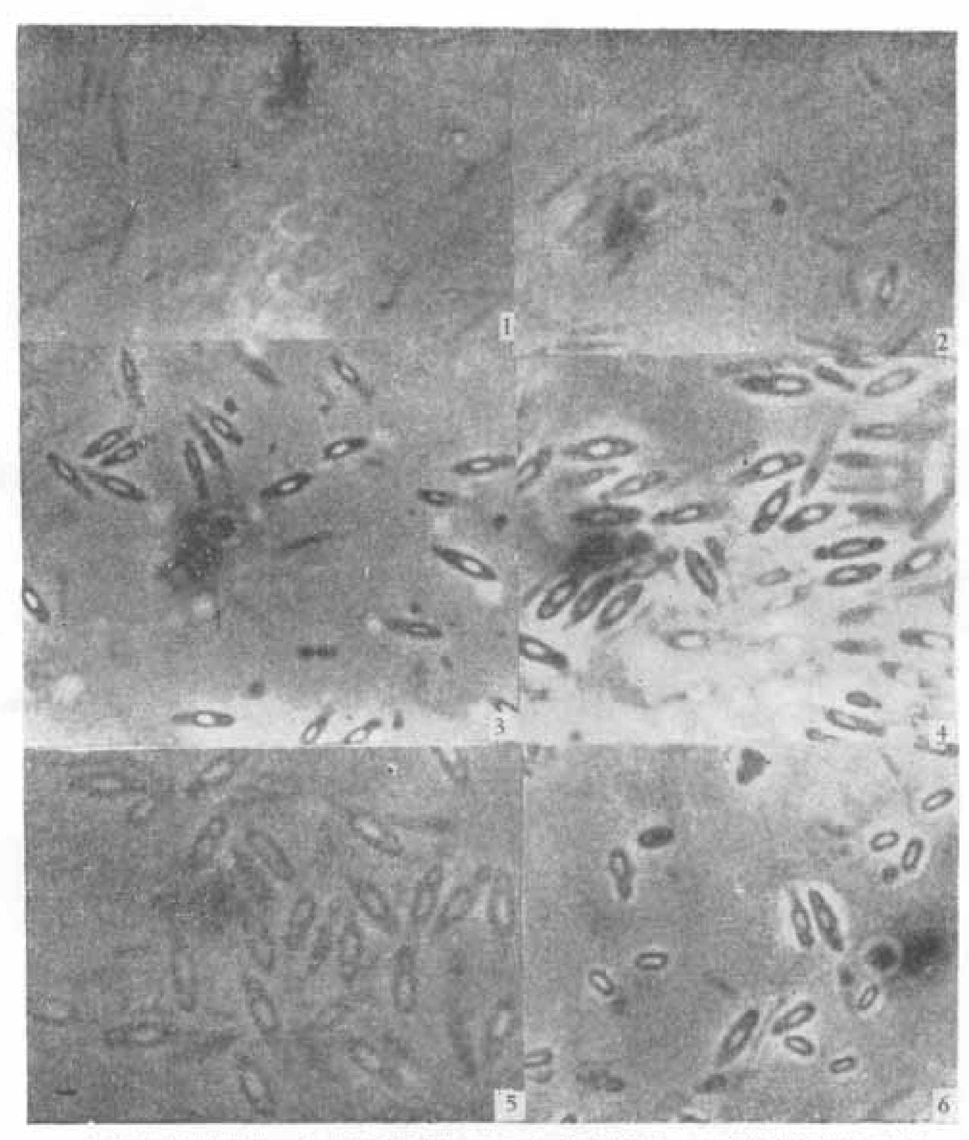
张书芳、冯祥兴、刘玉滨　1975　乳状菌与金龟子。昆虫知识 12(2)：43。

杨明华　1980　乳状菌研究的有关问题。微生物学通报 73：129—32。

RESEARCHES AND APPLICATION OF A NEWLY FOUND SPORE-FORMING *BACILLUS* (LURU 1) IN CONTROLLING WHITE GRUBS

SONG XIE-SONG QI SHU-LIANG
(*Institute of Peanut Research*)

In 1977 a line of spore-forming *Bacillus* was sifted from diseased white grubs of *Holotrichia oblita* (Fald.) in Dacaizhuang Production Brigade, Lenshu County, Shandong Province. The sporangium measures 3.238 × 0.803 μ. At one end or both ends it bears parasporal crystal which has high refractivity to light. The monoparasporal crystal is 0.78 × 0.57 μ; the diparasporal crystal at one end is 0.66 × 0.57 μ and that at the other end is 0.54 × 0.43 μ. The blastospore measures 1.411 × 0.693 μ. It showed high pathogenecity to the epidemic scarabeid species *H. oblita.* We succeeded to produce this *Bacillus* as a microbial insecticide by feeding the white grubs with the pathogens and harvesting the infected insects. In laboratory feeding experiments the pathogenetic rate approached to 65.6% (38.8—100%). In field tests the average pathogenetic rate was 37.96% (25.0—64.71%), the population of the white grubs had a decrease amounted to 77.2% (47.0—85.7%), the rate of damage prevention was 68.6% (43—83%), and peanut yield increase reached 134% (126—156%) when the insecticide was used in the dosage of 2.5 trillion spores permu. The spores can live and multiply for a long time and can disperse in the soil. This *Bacillus* is effective as a pathogen that can be used to reduce the damage caused by the white grubs.



1、2. 营养体增殖期；3. 伴孢体形成期 4、5、6. 芽孢成熟期。1—6 倍数为 90×6.3×2